

Citation:Agustini (2017) Identifikasi Senyawa Aktif dan Toksisitas Hayati Ekstrak *N*-Heksana, Etil Asetat dan Etanol Mikroalga *Tetraselmis Chuii* Secara Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) *Warta IHP*, 34(1),8-17

Halaman | 8

Identifikasi Senyawa Aktif dan Toksisitas Hayati Ekstrak *N*-Heksana, Etil Asetat dan Etanol Mikroalga *Tetraselmis Chuii* Secara Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Identification of Active Compound and Biological Toxicity of Extract of n-Hexane, Ethyl Acetate and Ethanol From Microalgae Tetraselmis chuii with Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Ni Wayan Sri Agustini

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI
wayan_sa2002@yahoo.com

Riwayat Naskah:

Diterima 06,2017
Direvisi 07,2017
Disetujui 07,2017

ABSTRAK. *Tetraselmis chuii* adalah salah satu jenis mikroalga yang termasuk ke dalam kelas Chlorophyceae, dan mempunyai prospek sebagai penghasil senyawa bioaktif yang bermanfaat sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, antitumor, antikanker dan lain-lain. Uji potensi suatu senyawa bioaktif diantaranya dengan melakukan uji toksisitas hayati menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Senyawa bioaktif diekstraksi menggunakan metode sokletasi, dengan berbagai tingkat kepolaran yaitu *n*-heksana (non polar), etil asetat (semi polar) dan etanol(polar). Uji toksisitas dilakukan terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan menghitung nilai LC_{50} . Identifikasi senyawa dengan menggunakan Kromatografi Gas Spektrofotometer Massa (KG-SM). Hasil penelitian menunjukkan bahwa toksisitas hayati dari ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan etanol dengan nilai LC_{50} secara berturut-turut adalah 39,30 ppm (*n*-heksana); 38,53 ppm (etil asetat); 239,12ppm (etanol). Tahap selanjutnya ekstrak *n*-heksana dan etil asetat dilakukan fraksinasi dan penyederhanaan fraksi. Pada ekstrak *n*-heksana diperoleh 4 fraksi, sedangkan ekstrak etil asetat diperoleh 6 fraksi. Toksisitas hayati pada fraksi *n*-heksana adalah fraksi no 2 dengan nilai LC_{50} sebesar 32,61 ppm, mengandung Phytol 2 – Hexadecen – 1 – ol 3,7,11,15 – tetramethyl dan 1,2 Benzendicarboxylic acid, mono (2 – ethylhexyl) ester sedangkan pada ekstrak etil asetat nilai LC_{50} tertinggi diperoleh dari fraksi no 1 yaitu 38,44 ppm, mengandung 1,2 Benzendicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak *n*-heksana dan etil asetat dari *T. chuii* bersifat toksik dan berpotensi sebagai salah satu alternatif obat antikanker alami.

Kata kunci : *Tetraselmis chuii*, ekstrak *n*-heksana, etil asetat, etanol, toksisitas hayati.

ABSTRACT. *Tetraselmis chuii* is Chlorophyceae microalgae class, and has a great prospect as producer of bioactive compound, as an antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, anticancer and others. To assess potential of bioactive compound is by biological toxicity assay using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Bioactive compounds were extracted by soxhletation with different degrees of polarity, *n*-hexane (non-polar), ethyl acetate (semi-polar) and ethanol (Polar). Toxicity tests conducted on shrimp larvae *Artemia salina* Leach to find out LC_{50} values. Identification of compound using Gas Chromatography Mass Spectrophotometer (GC-MS). The results of LC_{50} of extract *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol respectively are 39.30 ppm 38.53 ppm 239.12ppm, respectively. The next stage, *n*-hexane and ethyl acetate extracts were fractionated. Four and

six fractions were obtained from n-hexane and ethyl acetate, respectively. Biological toxicity of n-hexane extract was tested at fraction number 2 with a value of the LC_{50} is 32.61 ppm, containing Phytol 2 - Hexadecen - 1 - ol 3,7,11,15 - tetramethyl and 1.2 Benzendicarboxylic acid, mono (2 - ethylhexyl) ester, while ethyl acetate was tested at fraction number 1 with a value of LC_{50} is 38.44 ppm, containing 1.2 Benzendicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester. Based on the results obtained, extract n-hexane and ethyl acetate from *T. chuii* are toxic and potential as natural anticancer drugs.

Keywords: *Tetraselmis chuii*, extract n-hexane, ethyl acetate, ethanol, biological toxicity.

1. Pendahuluan

Di Indonesia penggunaan obat herbal sebagai upaya kesehatan cenderung meningkat. Hal ini dikarenakan adanya isu *back to nature*. Masyarakat berasumsi bahwa bila digunakan dengan dosis yang benar dan tepat, obat herbal mempunyai efek samping relative kecil. Selain itu, obat herbal bisa memiliki lebih dari satu efek farmakologi (Katno, 2008).

Usaha penyembuhan umumnya relatif mahal dan memiliki efek samping yang besar. Hal tersebut mendorong untuk mencari senyawa-senyawa baru, dan senyawa-senyawa tersebut dapat ditingkatkan pemanfaatannya sebagai salah satu kandidat obat yang berkhasiat. Senyawa-senyawa toksik dapat diperoleh dari bakteri, tanaman, termasuk mikroalga. *Tetraselmis chuii* merupakan mikroalga dari golongan alga hijau kelas Chlorophyceae, dan mempunyai prospek sebagai salah satu alternatif penghasil senyawa bioaktif potensial. Mikroalga *Tetraselmis chuii* dipilih karena masih kurangnya informasi tentang uji toksisitas dari mikroalga tersebut dan mengingat kandungan mikroalga *Tetraselmis chuii* yaitu, protein 46,5%, lemak 12,3% dan karbohidrat 25% (Tibbetts, 2015).

Salah satu metode untuk mendapatkan senyawa bioaktif yaitu dengan cara soxhletasi. Soxhletasi merupakan penyarian berkesinambungan, kandungan senyawa yang diperoleh tergantung pada tingkat kepolaran pelarut yang digunakan. Pelarut non polar seperti n-heksana akan melarutkan lemak, terpenoid, dan steroid, pelarut semi polar seperti etil asetat akan melarutkan protein, xanton, flavonoid dan senyawa polifenol dan pelarut polar seperti etanol akan melarutkan senyawa seperti karbohidrat (Harbone, 1996).

Salah satu cara untuk mengetahui potensi suatu senyawa sebagai alternatif obat baru adalah dengan melakukan uji toksisitas hayati. Prinsip uji toksisitas adalah bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan

bersifat obat jika diberikan pada dosis rendah. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang merupakan uji pendahuluan untuk menentukan apakah suatu senyawa mempunyai kandungan bioaktif dan memiliki aktifitas farmakologi. Metode tersebut memiliki beberapa keunggulan, yaitu lebih cepat, murah, mudah, tidak memerlukan kondisi aseptis dan tingkat kepercayaan 95%. Hewan uji yang digunakan adalah *Artemia salina* Leach (Meyer, *et al.*, 1982).

Toksitas dari suatu ekstrak disebabkan oleh kandungan senyawa yang terdapat dalam bahan atau ekstrak tersebut, maka perlu dilakukan uji identifikasi senyawa dengan KG-SM (Kromatografi Gas - Spektrofotometer Massa). Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian uji toksitas ekstrak *Tetraselmis chuii* dengan metode BSLT menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dan identifikasi senyawa dengan KG - SM.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Natrium klorida, Kalium nitrat, kalium dihidrogen fosfat, Natrium bikarbonat, Magnesium klorida, Kalsium klorida (0,2g/L), kalium klorida, Magnesium sulfat, Seng Sulfat, asam Borat, Mangan Klorida, Tembaga Sulfat, Ammonium Molibdat, n-Heksana, Etil Asetat, Etanol dan Air laut sintetik

2.2. Alat

Sentrifuga (Hitachi CT6EL), Spektrofotometer UV-Visible (Hitachi U 3900H), Mikroskop (Nikon-Japan), Neraca analitik (Precisa 303 Adam Scout No.SC 6010, USA), Oven (Heraeus), Vortex (Thermolyte), Rotary Evaporator (BUCHI Rotavapor R-200), desikator (Iwaki, Duraner), magnetik Stirrer (Thermolyte), mikropipet (Eppendorf), Spuit, Botol vial, Pipet Volume, Selang

Aerasi, Cawan Penguap, Alumunium Foil, Kotak Penetasan, Kaca Pembesar (LUP), Lampu TL 18 watt Lampu UV dan alat-alat gelas (pyrex).

2.3. Metode

2.3.1. Kultivasi Mikroalga *Tetraselmis chuii*

Tetraselmis chuii yang digunakan berasal dari Balai Besar Pengembangan Air Payau, Jepara. *T. chuii* dikultivasi dalam medium Johnson yang telah dimodifikasi yang terdiri dari NaCl (27g/L), MgSO₄·7H₂O (0,5g/L), MgCl₂ (1,5g/L), CaCl₂·4H₂O (0,2g/L), KNO₃ (1g/L), KH₂PO₄ (0,035g/L), NaHCO₃ (0,043g/L), Lar.Fe + EDTA (1 ml). *T. chuii* dikultivasi dalam botol ukuran 2 liter, pH awal 7,0, intensitas cahaya 2500 lux dan sistem aerasi secara terus menerus dengan menggunakan *Blower*. Kepadatan sel diukur dengan metoda Turbidimetri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 680 nm. *T. chuii* dipanen pada fase stasioner awal dengan cara disentrifus kecepatan 4000rpm selama 15 menit. Biomassa yang didapat kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C.

2.3.2. Skrining Fitokimia Biomassa *T. chuii*

2.3.2.1. Alkaloid

Biomassa ditimbang sebanyak 100 mg dan dilembabkan dengan 5 ml ammonia 30% digerus dalam mortar, kemudian ditambahkan 20 ml kloroform. Setelah itu, campuran tersebut disaring dan filtrat berupa larutan organik diambil (Larutan A/Lar. A). Lar. A diambil 1 ml dan ditambahkan dengan 10 ml larutan HCl 1:10 lalu dikocok hingga homogen dan diambil larutan bagian atasnya (Larutan B/Lar. B). Lar. A ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff dan Lar. B ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Jika pada Lar. A terbentuk endapan jingga dan pada Lar. B terbentuk endapan kekuning-kuningan, maka menunjukkan adanya alkaloid (Indrayani, *et al.*, 2006).

2.3.2.2. Flavonoid

Biomassa ditimbang sebanyak 100 mg dan ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang akan digunakan sebagai larutan percobaan. Sebanyak 5 ml filtrat ditambahkan dengan serbuk atau lempeng magnesium, setelah itu ditambahkan 1 ml HCl dan amil alkohol, kocok kuat dan biarkan memisah. Jika

terbentuk warna jingga pada lapisan amil alkohol maka flavonoid positif (Indrayani, *et al.*, 2006)

2.3.2.3. Saponin

Uji saponin dengan menggunakan metode Forth. Biomassa ditimbang sebanyak 100 mg dan ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang akan digunakan sebagai larutan percobaan. Setelah itu, diambil 10 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu dikocok secara vertikal selama 10 detik kemudian didiamkan selama 10 menit akan terbentuk busa yang stabil menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, jika ditambahkan 1 tetes HCl 1% busa tetap stabil. (Setyorini *et al.*, 2008)

2.3.2.4. Kuinon

Biomassa ditimbang sebanyak 100 mg dan ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang akan digunakan sebagai larutan percobaan. Setelah itu, diambil 5 ml dari dan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1N dan akan terbentuk warna merah intensif menunjukkan adanya senyawa golongan kuinon (Prasetyorini, *et al.*, 2011)

2.3.2.5. Triterpenoid

Biomassa ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dimaserasi 20 ml dengan Eter selama 2 jam (didalam wadah dengan penutup rapat), kemudian disaring dan diambil filtratnya. Setelah itu, filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu dan ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄. Terbentuknya warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid (Isnawati, *et al.*, 2008)

2.3.2.6. Kumarin

Biomassa ditimbang sebanyak 100 mg, ditambahkan 10 ml pelarut kloroform dan dipanaskan selama 20 menit. Setelah dingin disaring, dan filtrat diuapkan dengan cawan penguap sampai kering. Residunya ditambahkan air panas sebanyak 10 ml, setelah dingin tambahkan 0,5 ml larutan ammonia NH₄OH 10%, amati dibawah sinar lampu ultraviolet, maka akan terjadi fluoresensi warna kuning kehijauan atau kebiruan

yang menunjukkan adanya senyawa golongan kumarin (Isnawati, et al., 2008)

2.3.3. Ekstraksi Biomassa *T. chuii* dengan metode soxhletasi

Sebanyak 20 gr biomassa kering diekstraksi dengan cara soxhletasi. Pelarut yang digunakan secara berturut-turut, diawali dengan *n*-heksana, etil asetat dan etanol. Masing-masing pelarut diekstraksi selama 7 jam. Hasil ekstraksi dari ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan etanol kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai pekat.

3.1. Uji toksisitas hayati (Meyer, et al. 1982).

3.1.1. Penetasan Telur *Artemia salina* Leach

Kurang lebih 20 mg telur *Artemia salina* Leach dimasukan kedalam bejana penetas yang telah berisi air laut sintetik dan disinari dengan lampu TL 18 Watt. Setelah 24 jam telur yang menetas menjadi *naupilii* dan dipindahkan ketempat lain. 24 jam kemudian *naupilii* tersebut sudah dapat digunakan sebagai hewan uji.

3.1.2. Pembuatan Larutan Uji

Konsentrasi larutan uji yang dibuat adalah 1000 ppm, 100 ppm dan 10 ppm, masing – masing dengan tiga kali pengulangan, serta 1 vial untuk kontrol positif. Masing-masing ekstrak dibuat larutan induk, sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dengan 5 ml pelarut yang sesuai. Jika sampel sukar larut, tambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 1% sebanyak 10-50 µl.

3.1.3. Pelaksanaan Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* L

Larutan uji *n*-heksana, etil asetat dan etanol dipipet berturut – turut 500 µl, 50 µl dan 5 µl yang masing – masing dimasukan ke dalam vial kemudian diuapkan sampai kering. Setelah itu, tambahkan sebanyak 3 ml air laut dan diaduk hingga homogen, kemudian masukkan 10 ekor *naupilii*, dan tambahkan air laut sampai 5 ml. Untuk setiap konsentrasi lakukan tiga kali pengulangan. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva yang mati dan hidup.

3.1.4. Perhitungan

3.1.4.1. Pengukuran mortalitas larva *Artemia salina* Leach dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Mortalita (\%)} = \frac{\text{Akumulasi mati}}{\text{Akumulasi mati} + \text{Akumulasi hidup}} \times 100\%$$

3.1.4.2. Menghitung LC_{50} dengan menggunakan regresi linier. $Y = a + bx$. Nilai LC_{50} pada uji toksisitas adalah konsentrasi larutan uji yang dapat menyebabkan kematian pada 50% hewan percobaan. Perhitungan LC_{50} menggunakan persamaan regresi antara log D sebagai sumbu x dan % sebagai sumbu y .

3.2. Fraksinasi dan Penyederhanaan Fraksi Ekstrak *n*-Heksana dan Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom.

Fraksinasi dengan kromatografi kolom bertujuan untuk mendapatkan fraksi yang mengandung senyawa lebih sederhana. Ekstrak *n*-heksana dan etil asetat difraksinasi dengan kromatografi kolom secara isokratik menggunakan fase gerak yang telah dipilih. Fase diam yang digunakan adalah silika gel₆₀. Setiap fraksi yang diperoleh dari hasil kromatografi kolom dilakukan KLT menggunakan lempeng silika gel GF₂₅₄. Setiap fraksi yang memberikan profil bercak yang sama digabung menjadi satu fraksi. Setelah itu, hasil penggabungan fraksi diuji kembali toksisitas hayatinya

3.3. Identifikasi senyawa dengan KG-SM

Identifikasi senyawa dilakukan terhadap fraksi 1 etil asetat dan fraksi 2 *n*-heksana. Instrumen yang digunakan adalah Agilent 19091S-436, kolom HP-5ms, (0.25mm diameter id, panjang 60 mm, ketebalan film 0.25 µm) volume injeksi: 1 µl, temperatur inlet: 290°C, temperatur AUX: 290°C, temperatur program: 70°C (15 menit) - 290°C (25 menit), mode aliran gas : konstan dan gas pembawa: Helium.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Hasil Uji Fitokimia

Berdasarkan hasil skrining fitokimia terhadap biomasa *T. chuii*, didapat hasil yang positif terhadap senyawa steroid dan kumarin (Tabel 1). Kedua senyawa tersebut yang diduga memiliki toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Steroid adalah senyawa triterpen yang senyawa dasarnya terdiri dari cincin siklopentana perhidrofenantren

(Lednicer, 2011).Sedangkan kumarin adalah suatu senyawa fenol yang memiliki aktifitas biologis diantaranya sebagai antikoagulan darah dan menghambat aktifitas zat karsinogenik (Harbone, 1987). Senyawa steroid dan kumarin dapat berfungsi sebagai racun perut dengan mekanisme mengganggu alat pencernaan dari larva udang *Artemia salina* L. Senyawa ini juga dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva udang *Artemia salina* L yang mengakibatkan larva udang *Artemia salina* L gagal dalam mendapatkan stimulus rasa dan tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva udang *Artemia salina* L akan mati kelaparan (De Padua et.al., 1999).

Tabel 1.
Hasil uji fitokimia biomasa *T. chuii*

Golongan Senyawa	Hasil
Alkaloid	-
Flavonoid	-
Saponin	-
Kumarin	+
Steroid	+
Kuinon	-

3.2. Ekstraksi Biomassa *T. chuii* secara Sokhletasi

Ekstraksi biomassa *T. chuii* dilakukan dengan cara sokhletasi, dengan proses pemanasan zat aktif yang terkandung dalam biomassa dari mikroalga *T. chuii* dapat tersari secara sempurna, dan pelarut yang digunakan lebih sedikit serta proses isolasi yang lebih cepat. Pada penelitian ini ekstraksi dilakukan dengan menggunakan 3 pelarut yang berbeda, diawali dengan pelarut *n*-heksana (non polar), etil asetat (semi polar), dan etanol (polar).Berdasarkan literatur, pelarut non polar (*n*-heksana) mampu mengekstrak senyawa yang larut dalam pelarut non polar seperti steroid, asam lemak, terpenoid, karotenoid. Pelarut semi polar (etil asetat) mampu mengekstrak senyawa yang larut dalam pelarut semi polar seperti polifenol, alkaloid, kumarin dan flavonoid, sedangkan pelarut polar (etanol) mampu mengekstrak senyawa yang larut dalam pelarut polar seperti komponen fenolik, glikosida, saponin dan tanin (Redja, 1982).

Berdasarkan studi yang telah dilakukan, ekstrak kering yang diperoleh dari masing-masing

pelarut jumlahnya berbeda-beda. Bobot ekstrak yang diperoleh seperti terlihat pada Tabel 2. Hasil pengeringan ekstrak *n*-heksana sebesar 0,196 gram, etil asetat 0,354 gram dan etanol 0,737 gram. Persentase rendemen ekstrak menunjukan jumlah senyawa yang tersari dari masing-masing pelarut dengan jumlah biomassa mikroalga *T. chuii*. Rendemen tertinggi ditunjukkan oleh pelarut etanol yaitu 3,685 % dan terendah dihasilkan oleh pelarut *n*-heksana yaitu 0,98%. Tingginya nilai rendemen pada etanol menunjukkan bahwa pada biomasa *T.chuii* mengandung banyak senyawa polar (Tabel 2).

3.3. Uji toksisitas secara Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Hasil uji toksisitas yang dilakukan dengan metode BSLT mengacu pada penelitian Meyer et al (1982), dimana Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan pengujian awal untuk menentukan apakah suatu senyawa mempunyai kandungan bioaktif. Selain itu metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan akurat. Penggunaan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji karena identik dengan sel kanker (Meyer, et al., 1982).Oleh karena itu, jika ekstrak atau senyawa yang digunakan memiliki aktivitas toksik yang tinggi maka ekstrak atau senyawa tersebut dapat berpotensi sebagai obat dimasa yang akan datang. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik, bila nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.

Pada Tabel 3 terlihat, setiap peningkatan konsentrasi ekstrak terjadi kenaikan tingkat mortalitas dari larva udang. Ini menunjukkan bahwa, semakin tinggi konsentrasi suatu zat yang diberikan, semakin besar pula jumlah larva udang yang mati. Hal ini berarti, semakin tinggi konsentrasi yang diberikan semakin besar pula keracunan yang ditimbulkan. Tingkat mortalitas yang paling tinggi terjadi pada konsentrasi 1000 ppm.

Pada Tabel 3 juga dapat dilihat, ekstrak *n*-heksana menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 100 dan 1000 ppm yaitu dengan persentase kematian sebesar 63,16% dan 84,84.

Tabel 2.Hasil ekstraksi biomasa *T. chuii*

No	Jenis Pelarut	Hasil Sokhletasi (ml)	Hasil Evaporasi (ml)	Hasil Pengeringan (g)	Rendemen Ekstrak (%)
1	<i>n</i> -heksana	511	4	0,196	0,98
2	Etil Asetat	630	6	0,354	1,77
3	Etanol	473	27	0,737	3,685

Ekstrak etil asetat menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 100 dan 1000 ppm dengan persentasi kematian sebesar 74,42% dan 95,16% dan ekstrak etanol menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 1000 ppm yaitu 81,58%. Nilai LC_{50}

yang ditunjukkan oleh ekstrak etil asetat sebesar 38,53 ppm dan ekstrak *n*-heksana sebesar 39,30 ppm, sedangkan pada ekstrak etanol menunjukan nilai LC_{50} yang lebih besar yaitu sebesar 239,38 ppm. Berdasarkan studi ini, ekstrak *n*-heksana dan etil asetat memiliki toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol. Tahap selanjutnya untuk mendapatkan ekstrak yang lebih murni dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom terhadap *n*-heksana dan etil asetat.

Tabel 3.Hasil ujitoksitas hayati ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan etanol dari biomasa *T. chuii*

Fraksi	Vial	Bobot ekstrak (mg)
F1	2	90,7
F2	3	75,5
F3	4 – 5	78,4
F4	6	74,3
F5	7 – 15	67,2
F6	16 – 69	62,1

Berdasarkan hasil nilai LC_{50} dan uji fitokimia, senyawa kumarin dan steroid yang terdapat dalam mikroalga *T. chuii* memiliki peran dalam tingkat toksisitas (LC_{50}) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Senyawa kumarin dan steroid merupakan metabolit sekunder yang mudah larut dalam pelarut non polar maupun semi polar, yang menyebabkan nilai LC_{50} pada *n*-heksana dan etil asetat lebih kecil dibandingkan pada ekstrak etanol yang merupakan pelarut polar. Carballo *et.al.*, (2002) menyatakan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara sitotoksitas dan letalitas larva *Artemia salina* leach. Oleh karena itu, apabila harga LC_{50} suatu ekstrak bersifat toksik berdasarkan metode BSLT, maka ekstrak tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker.

3.4. Kromatografi Kolom dan Penyederhanaan Fraksi ekstrak *n*-heksana dan etil asetat

Penyederhanaan fraksi dilakukan bertujuan agar diperoleh senyawa yang lebih murni. Fraksinasi dilakukan pada ekstrak *n*-heksana dan etil asetat yang memiliki nilai LC_{50} paling toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Ekstrak *n*-heksana dan etil asetat difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan eluen untuk fraksi *n*-heksana yaitu *n*-heksana : etil asetat (1:1) dan untuk fraksi etil asetat yaitu etilasetat : *n*-heksana (4:5). Fraksinasi dilakukan hingga semua senyawa yang terdapat didalam ekstrak *n*-heksana dan etil asetat terpisah secara sempurna

Fraksinasi ekstrak *n*-heksana menghasilkan 25 fraksi yang masing-masing sebanyak 5 ml. Hasil fraksinasi kemudian dilakukan penyederhanaan fraksi, berdasarkan nilai R_f yang sama maka diperoleh 4 fraksi (Tabel 4). Sedangkan fraksinasi ekstrak etil asetat mendapatkan 69 fraksi, setelah dilakukan penyederhanaan fraksi diperoleh sebanyak 6 fraksi (Tabel 5).

Tabel 4.Hasil penyederhanaan fraksi ekstrak *n*-heksana dari mikroalga *T. chuii*

Fraksi	Vial	Bobot ekstrak (mg)
F1	2	70,6
F2	3	74,8
F3	4	65,9
F4	5 – 25	57,1

Tabel 5Hasil penyederhanaan fraksi etil asetat dari mikroalga *T. chuii*

3.5. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Ekstrak	Konsentrasi	Kematian (%)	LC_{50} (bpj)
<i>n</i> -heksana	1000	84,85	39,30
	100	63,16	
	10	33,33	
etil asetat	1000	95,16	38,53
	100	74,42	
	10	24,39	
	1000	81,58	
Etanol	100	20,00	239,38
	10	4,81	

rhada Hasil Dari Penyederhanaan Fraksi

Hasil uji toksisitas fraksi *n*-heksana, menunjukkan bahwa fraksi 1 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 10 ppm hingga 100 ppm dengan persentasi kematian sebesar 23,08% hingga 51,11% dengan nilai LC₅₀ sebesar 67,09 ppm, fraksi 2 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 10 ppm hingga 100 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 31,11% hingga 70% dengan nilai LC₅₀ sebesar 32,61 ppm, fraksi 3 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 100 ppm hingga 1000 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 45,83% hingga 97% dengan nilai LC₅₀ sebesar 78,07 ppm, sedangkan fraksi 4 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 100 ppm hingga 1000 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 44,44% hingga 59,6774% dengan nilai LC₅₀ sebesar 255,12 ppm. Nilai LC₅₀ yang dihasilkan dari semua fraksi lebih kecil dari 1000 ppm, hal ini menunjukkan bahwa semua fraksi memiliki efek toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach. Urutan hasil uji toksisitas terhadap fraksi *n*-heksana yaitu fraksi 2 > fraksi 1 > fraksi 3 lalu fraksi 4 (Tabel 6). Berdasarkan hasil uji toksisitas terhadap fraksi, maka hanya fraksi 2 yang dilanjutkan untuk dilakukan analisa KG-SM untuk mengidentifikasi jenis atau golongan senyawa kimia.

Tabel 6.
Hasil uji toksisitas hayati pada fraksi *n*-heksana

Ekstrak	Fraksi	Kons	Kematian (%)	LC ₅₀ (bpj)
n-heksana	1	1000	94,34	67,09
		100	51,11	
		10	23,08	
	2	1000	96,92	32,61
		100	70	
		10	31,11	
	3	1000	97	78,07
		100	45,83	
		10	19,64	
	4	1000	59,68	255,12
		100	44,44	
		10	24,29	

Hasil uji toksisitas terhadap fraksi etil asetat pada Tabel 7, menunjukkan bahwa fraksi 1 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 10 hingga 100 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 28,57% hingga 65,91%, fraksi 2 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 10 hingga 100 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 12,19% hingga 68,57%, fraksi 3 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 100 hingga 1000 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 38,46% hingga 66%, fraksi 4 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 100 hingga 1000 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 49,12% hingga 75,86%, fraksi 5 menyebabkan

kematian 50% pada konsentrasi 100 ppm hingga 1000 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 45,31% hingga 71,19%, fraksi 6 menyebabkan kematian 50% pada konsentrasi 10 ppm hingga 100 ppm yaitu dengan persentasi kematian sebesar 20% hingga 51,92 %.

Pada Tabel 7 juga terlihat nilai LC₅₀ yang dihasilkan dari semua fraksi lebih kecil daripada 1000 ppm, dan urutan hasil uji toksisitasnya yaitu fraksi 1 > fraksi 2 > fraksi 6 > fraksi 4 > fraksi 5 > fraksi 3. Oleh karena itu, fraksi 1 dilanjutkan untuk dilakukan analisa KG-SM untuk diidentifikasi jenis atau golongan senyawa kimia.

Tabel 7.
Hasil uji toksisitas hayati ekstrak etil asetat

Ekstrak	Fraksi	Kons	Kematian (%)	LC ₅₀ (bpj)
Etil asetat	1	1000	100	38,44
		100	65,91	
		10	28,57	
	2	1000	100	58,39
		100	67,57	
		10	12,19	
	3	1000	66	269,90
		100	38,46	
		10	8,06	
	4	1000	75,86	108,86
		100	49,12	
		10	22,03	
	5	1000	71,19	128,4
		100	45,31	
		10	26,15	
	6	1000	80,70	93,58
		100	51,92	
		10	20	

Hasil uji skrining fitokimia pada Tabel 1, menunjukkan adanya senyawa steroid dan kumarin didalam sel mikroalga *T. chuii* dan diketahui bahwa kedua senyawa ini lebih bersifat toksik dibandingkan dengan senyawa alkaloid, karena senyawa steroid yang berlebihan dalam tubuh memiliki efek negatif bagi makhluk hidup (16 Efek Samping Steroid, 2014).

Pada penelitian lain menyatakan bahwa ekstrak *n*-heksana dari daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vhal) yang mengandung senyawa sterol dan terpenoid bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan memiliki aktifitas antikanker (Indrayani, et.al., 2006)

3.6. Identifikasi senyawa ekstrak *n*-heksana dan etilasetat dengan GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spektrometri)

Identifikasi ekstrak *n*-heksana dilakukan hanya pada fraksi no 2, karena fraksi ini yang memiliki daya toksisitas tertinggi. Hasil identifikasi GC-MS yang dilakukan terhadap fraksi no 2 ekstrak *n*-heksana terdapat 2 senyawa yaitu Phytol 2-

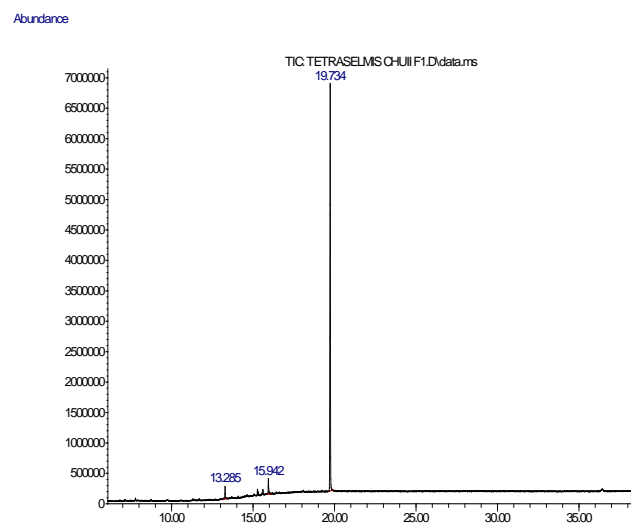
Hexadecen - 1 - ol, 3,7,11,15 - tetramethyl dan 1,2 - Benzenedicarboxylic acid, mono (2 - ethylhexyl) ester (Tabel 8 dan Gambar 1).

Senyawa Phytol 2-Hexadecen - 1 - ol, 3,7,11,15 - tetramethyl muncul pada menit ke 15,94 dengan luas area 3,94% dan berat molekul 296 dengan kemiripan 95%. Phytol merupakan senyawa alkohol diterpen asiklik campuran dari bentuk cis dan trans dari Phytol 2-Hexadecen - 1 - ol, 3,7,11,15 - tetramethyl. Menurut Trianto, et al. (2004), nama lain dari senyawa ini 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl, l. 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen 1-ol-, (2E, 7R, 11r), (E) -Phytol. 3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol dan merupakan senyawa terpenoid. Pada penelitian sebelumnya, senyawa terpenoid menunjukkan aktivitas farmakologi antara lain sebagai antiviral, antibakteri, antiinflamasi, antikanker, dan aktifitas inhibisi terhadap sintesis kolesterol. Hal ini didukung juga dengan penelitian lainnya menyatakan phytol merupakan kelas baru yang menjanjikan untuk pengobatan artritis rheumatoid dan penyakit inflamasi (Made et.al., 2013). Struktur dari senyawa tersebut seperti terlihat pada Gambar 2.

Tabel 8.

Hasil identifikasi senyawa fraksi ekstrak n-heksana

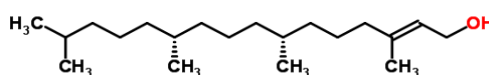
No	Nama Senyawa	RT	% area	RM	Qualit y (%)
1	Phytol 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl	15,94	3,74	C ₂₀ H ₄₀ O	50
2	Benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester	19,73	94,18	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	91



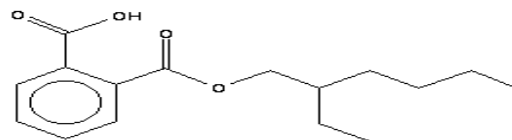
Gambar 1. Kromatogram fraksi 1 ekstrak n-heksana

Sedangkan senyawa yang kedua adalah Benzenedicarboxylic acid, mono (2 - ethylhexyl)

ester muncul pada menit ke 19,73 dengan luas area 94,18% dan berat molekul 278 dengan % kemiripan 91%. Senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester mempunyai nama lain phthalic acid (mono (2-ethylhexyl) phthalate, phthalic acid mono (2-ethylhexyl) ester, 1-benzenedicarboxylic acid mono-octyl ester yang merupakan senyawa ester aromatik (asam dikarboksilat aromatik) atau asam lemak tak jenuh. Pada penelitian sebelumnya mengenai ekstrak Gorgonian bahwa senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid bersifat toksik dan dapat dikembangkan sebagai antikanker (Trianto, et.al., 2004). Berikut adalah struktur senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester (Gambar 3)



Gambar 2. Struktur senyawa Phytol 2-Hexadecen - 1 - ol, 3,7,11,15 - tetramethyl



Gambar 3. Struktur senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester

Berdasarkan hal tersebut maka senyawa Phytol 2-Hexadecen - 1 - ol, 3,7,11,15 - dan 1,2-benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester yang terkandung didalam ekstrak n-heksana yang mengandung senyawa toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.

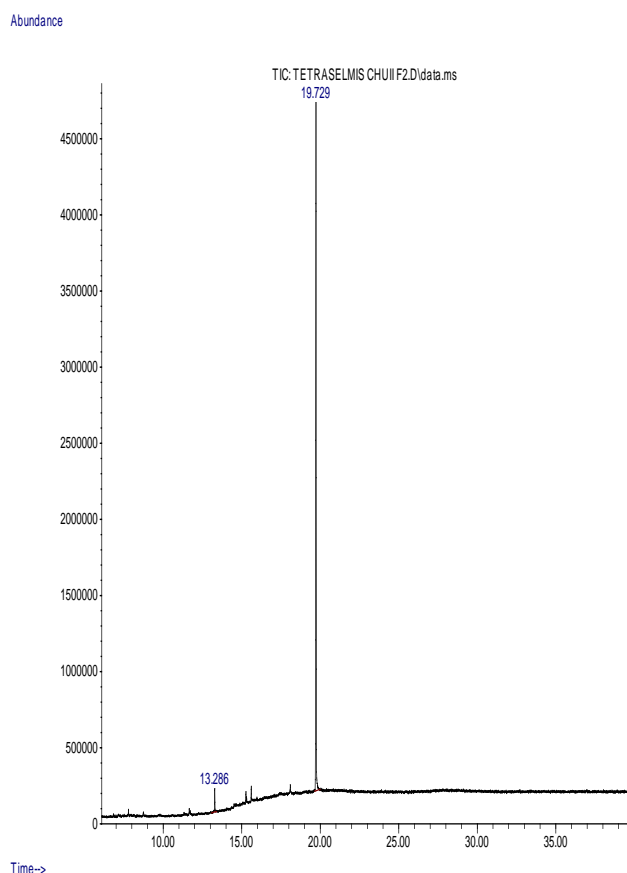
Tabel 9.

Hasil identifikasi fraksi 1 Fraksi n-heksana dari mikroalga *T. chuii*

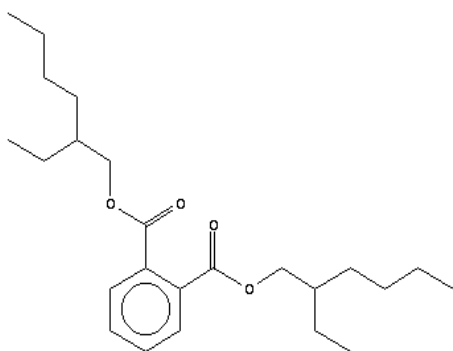
No	nama senyawa	RT	% Area	RM	Kualitas (%)
1	1,2 Benzenedicarboxylic acid, bis (2 - ethylhexyl) ester	19.73	97.49	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	91

Sedangkan hasil identifikasi untuk fraksi 1 pada ekstrak etil asetat dapat dilihat pada Tabel 9 dan pola kromatogramnya dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan uji toksisitas terhadap fraksi etil asetat mengandung senyawa 1,2 - Benzenedicarboxylic acid, bis (2 - ethylhexyl) ester. Nama lain dari senyawa tersebut adalah Phthalic acid, bis(2-ethylhexyl) ester; Bis(2-ethylhexyl) 1,2-benzenedicarboxylate.

Hasil penelitian pada studi ini mendukung penelitian yang dilakukan oleh Rahayu, et al., (2013), menyatakan bahwa senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester yang terdapat pada spons *Callyspongia aerizusa* memiliki aktivitas sebagai antikanker. Berikut adalah struktur senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester (Gambar 5).



Gambar 4. Kromatogram fraksi 1 ekstrak etil asetat



Gambar 5. Struktur senyawa 1,2 - Benzenedicarboxylic acid, bis (2 - ethylhexyl) ester

Berdasarkan hal tersebut, senyawa 1,2 - Benzenedicarboxylic acid, bis (2 - ethylhexyl) ester, termasuk golongan asam lemak yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat yang mempunyai sifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.

4. KESIMPULAN

Ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan etanol mikroalga *T. chuii* memiliki toksisitas hayati terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 39,30 ppm; 38,53 ppm ; 239,12 ppm. Nilai LC_{50} pada hasil fraksi yang paling toksik adalah ekstrak *n*-heksana pada fraksi 2 dan ekstrak etil asetat pada fraksi 1 dengan nilai LC_{50} berturut-turut 32,61 ppm; 38,44 ppm. Kandungan senyawa fraksi ekstrak *n*-heksana mikroalga *T. chuii* yang aktif terhadap larva udang *Artemia salina* Leach adalah Phytol 2-Hexadecen - 1 - ol, 3,7,11,15 - tetramethyl dan 1,2 - Benzenedicarboxylic acid, mono (2 - ethylhexyl) ester, sedangkan dari fraksi ekstrak etil asetat 1,2 - Benzenedicarboxylic acid, bis (2 - ethylhexyl) ester. Berdasarkan hasil tersebut maka, *T. chuii* berpotensi sebagai alternatif obat baru yang bersifat alami.

Daftar Pustaka

- 16 Efek Samping Steroid. (2014). Repts-id.com. Retrieved February 9, 2017, from <http://reps-id.com/16-efek-samping-steroid/>
- Isnawati, A., Mudahar, H., & Kamilatunisah. (2008). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Kumarin dari Tanaman Artemisia Annuia (I). *Media Litbang Kesehatan*, XVIII(3), 107-118.
- Carballo, J., Hernández, Z., Pérez, P., & García, M. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2, 17. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- De Padua LSN, Bunyapraphatsana RH, Lemmens MJ. (1999). *Medicinal and Poissinous Plant Research of South-East Asia* 12. Wageningen, the Netherland :Pudoc Scientific Publisher.
- Harbone, J. B. (1996). *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan* (Ed.2). Diterjemahkan oleh Padma, W.K., Soediro I., Bandung : ITB.
- Indrayani, L., Soetjipto, H., & Sihasale, L. (2006). Skrining fitokimia dan uji toksisitas ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. *Journal of Biological Researches*, 12(1), 57-61. <https://doi.org/10.23869/bphjbr.12.1.200610>
- Katno. (2008). *Tingkat Manfaat Kegunaan dan Efektivitas Tanaman Obat dan Obat Tradisional*. Karanganyar :B2P2T0-OT Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI.
- Lednicer D. (2011). *Steroid Chemistry at a Glance*. Hoboken: Wiley.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Prasetyorini, P., Wiendarlina, I. Y., & Peron, A. B. (2011). Toksisitas Beberapa Ekstrak Rimpang cabang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) pada Larva Udang (*Artemia*

- salina Leach). *FITOFARMAKA*, 1(2), 14–21. Retrieved from <https://journal.unpak.ac.id/index.php/fitofarmaka/article/view/160>
- Rahayu, M. R., Sibarani, J., & Swantara, I. M. D. (2013). Uji Toksisitas dan Identifikasi Ekstrak Etanol Spons *Callyspongia aerizusa* Terhadap Larva *Artemia salina* L. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 1(1), 1–7.
- Redja IW. (1982). *Dasar – dasar Analisis Kuantitatif dan Analisa Instrumen*. Jakarta :Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., & Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1109–1119. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0428-x>
- Trianto, Agus., HAS, Yan Yan., Ambriyanto., Retno Muwarni. (2004). Uji Toksisitas ekstrak Gorgonian *Isis Hiprus* Terhadap Naupilius *Artemia salina*. *Journal Ilmu Kelautan*, Universitas Diponegoro – FPIK. 9 (2), 61 – 66.